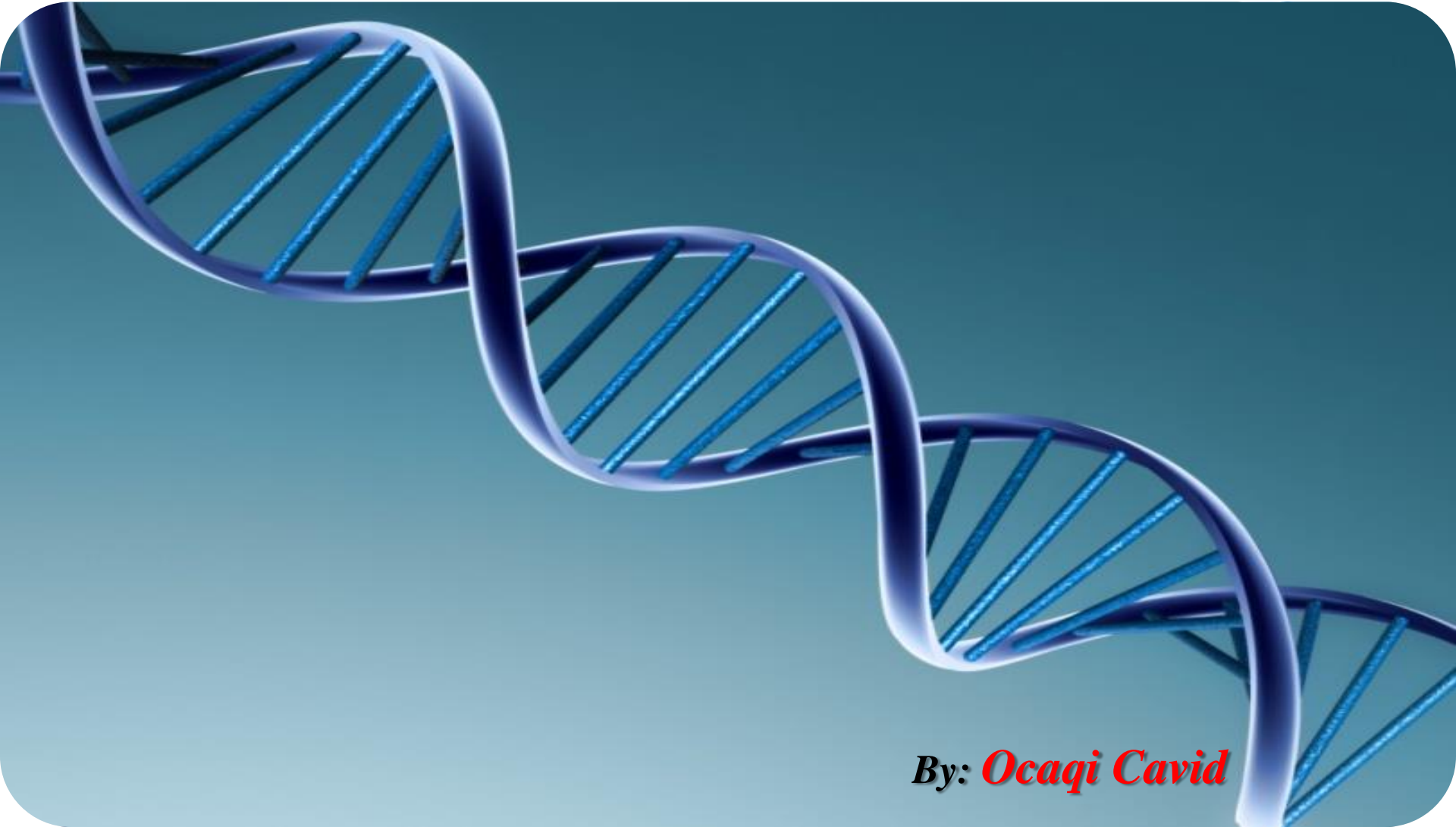
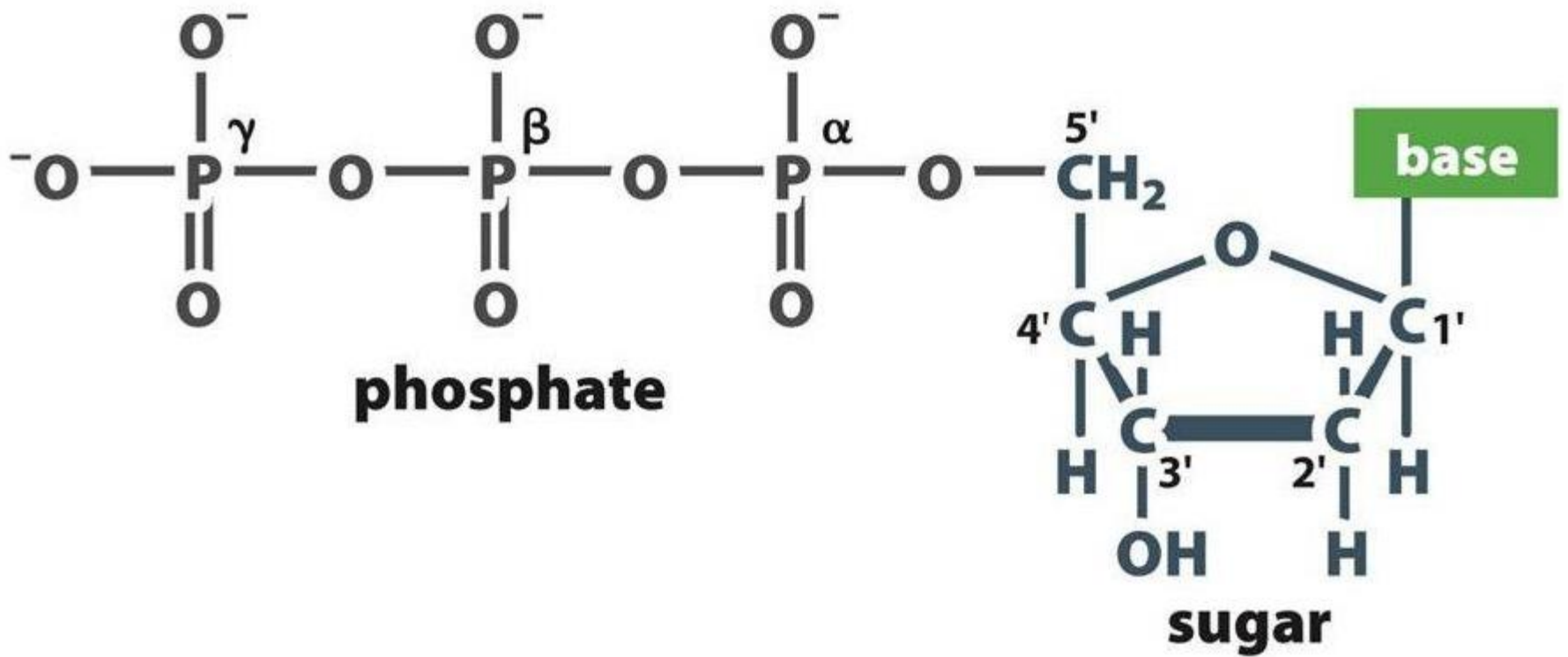
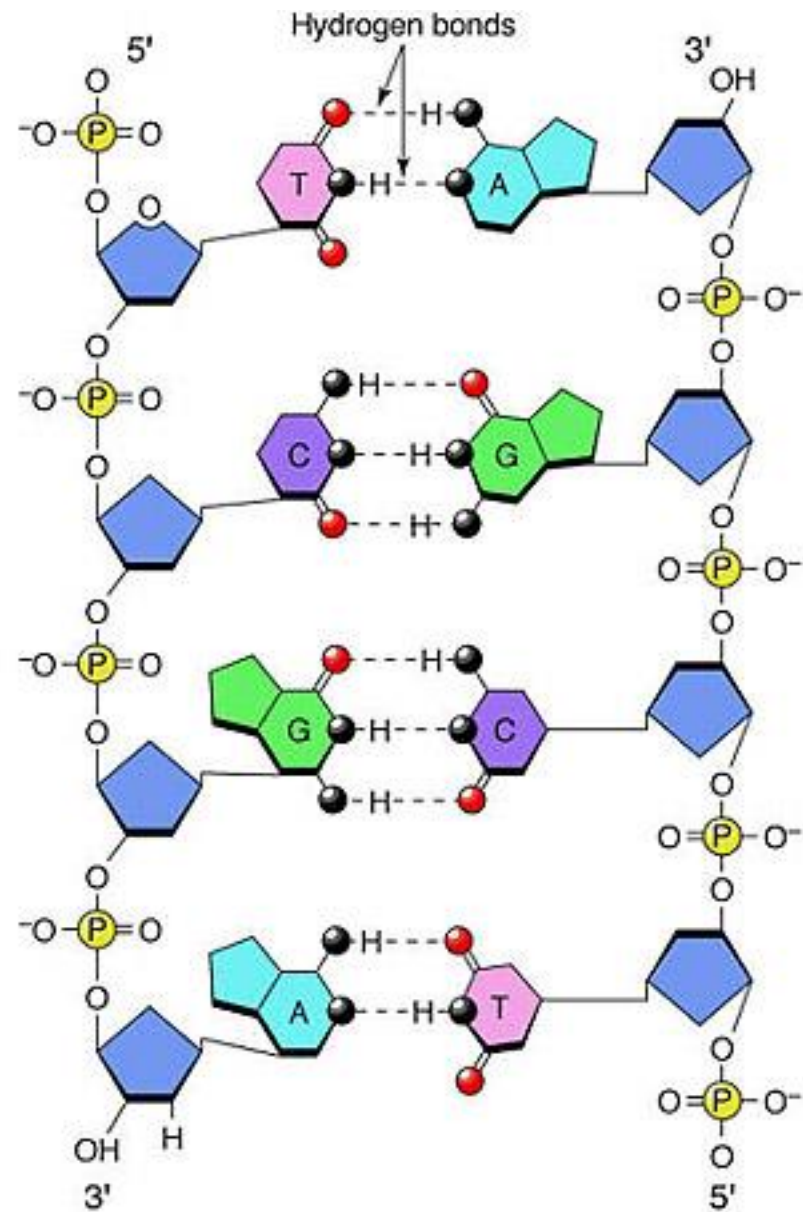
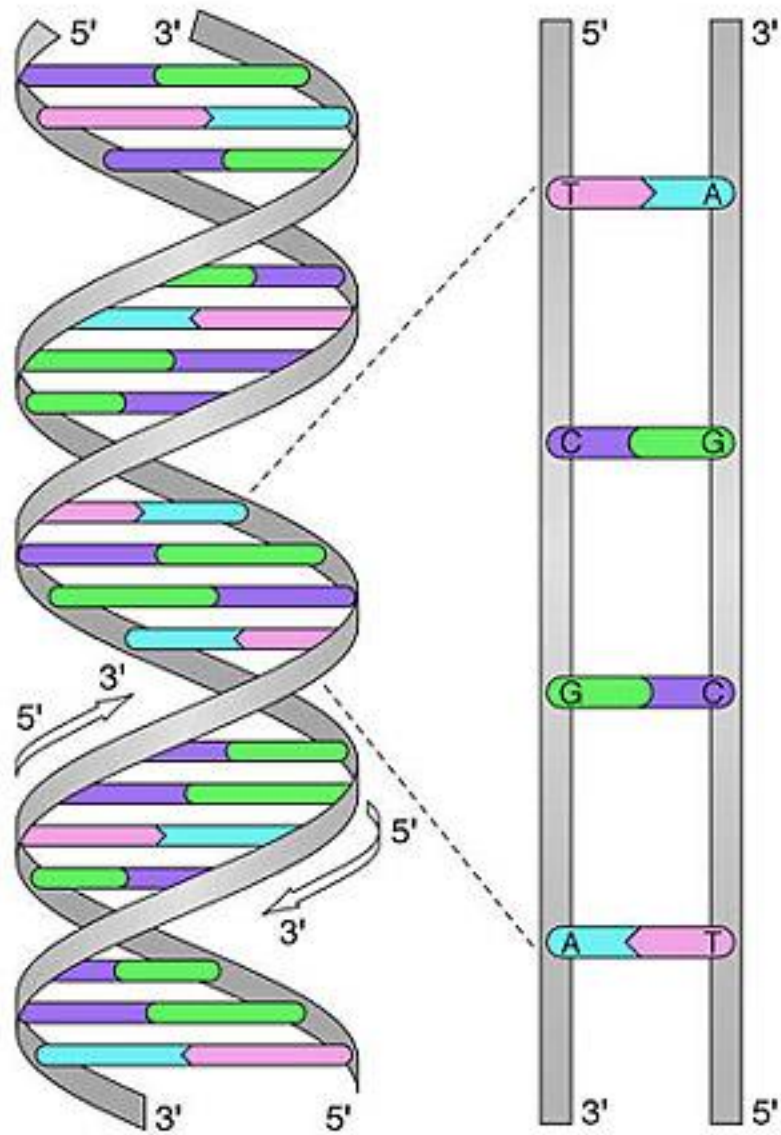


Genomun nukleotid ardıcılığının oxunma prinsipləri



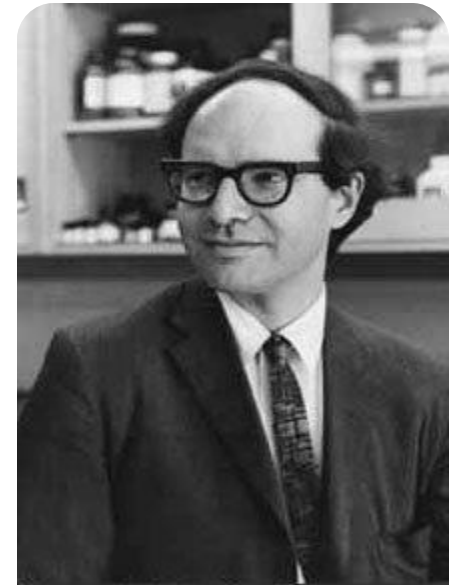
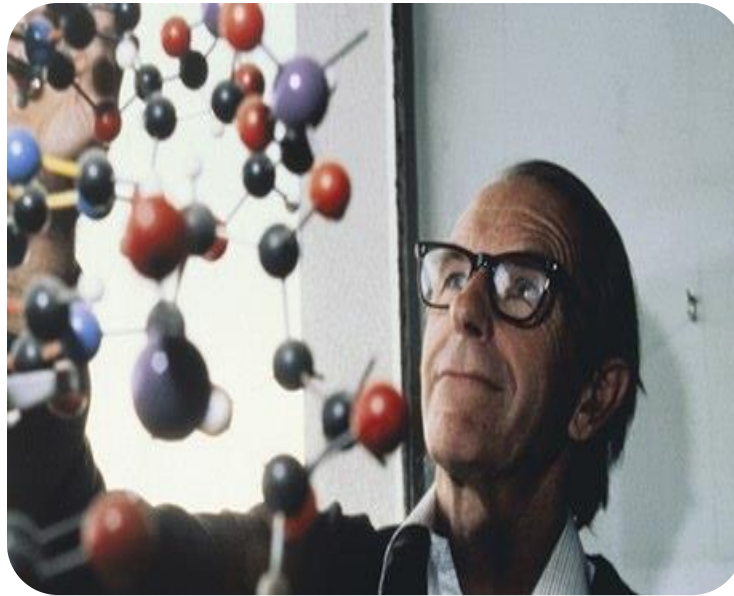
By: Ocaqi Cavid





Genomun **Sanger** üsulu əsasında nukleotid ardıcılığının oxunması

1974-cü ildə iki fərqli qrup, biri İngiltərədə Fredrik Sanger tərəfindən və digəri Amerikada **Maxam** və **Gilbert** tərəfindən eyni zamanda genomun nukleotid ardıcılığının oxunmasına nail olmuşlar və 1980-ci ildə birlikdə Nobel mükafatı ilə təltif edilmişlər.



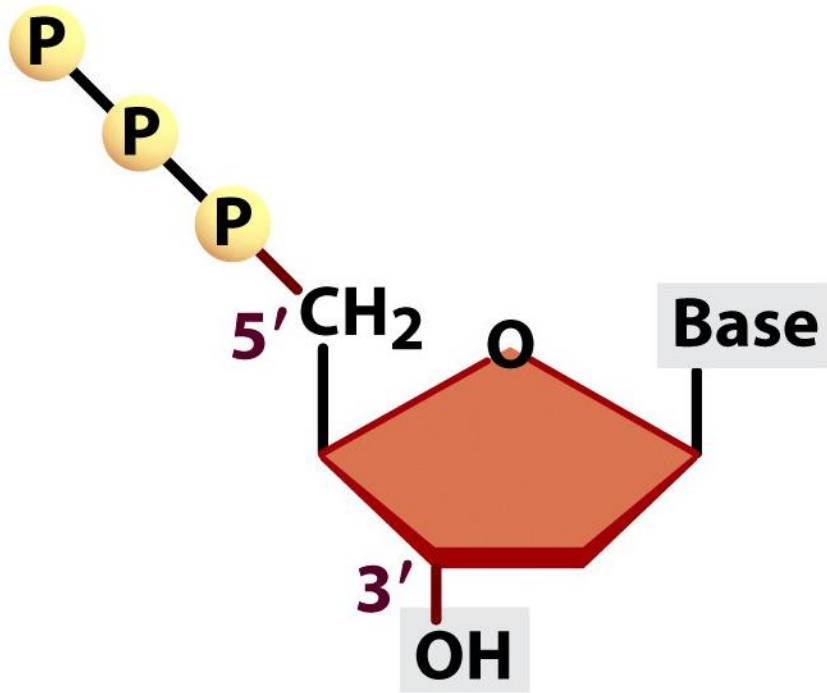
Walter Gilbert
Walter Gilbert

Sanger tərəfindən izah edilmiş metod asan və eyni zamanda DNT-nin təbii amplifikasiya proseslərinə tam oxşar olduğundan, Sanger-in şərəfinə sanger üsulu adlandırılmışdır.

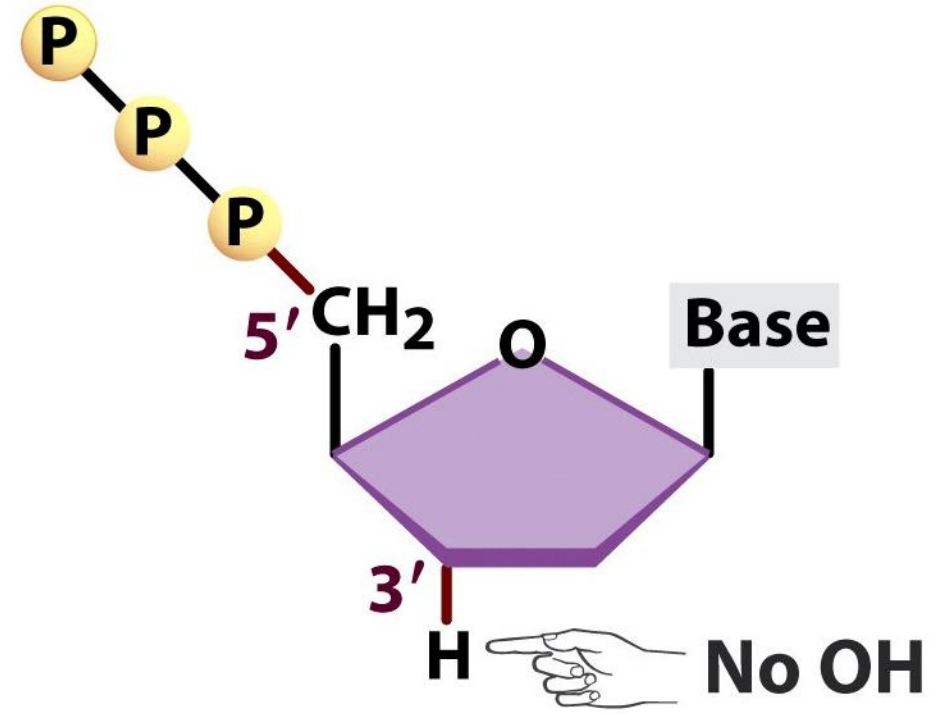


Eyni zamanda **dideoxy ardıcılığının oxunması** (*dideoxy sequencing*) və həmçinin **zəncirin terminasiyası** (*chain termination*) kimi adlanan Sanger metodu dideoxy nukleotidləri (*ddNTP's*) və normal nukleotidlərin əsasında həyata keçirilir.

*Dideoxy nukleotidləri mahiyyətə normal nukleotidlərə oxşar olub, 3' karbon hissəsində **hidroksil** (OH) qrupu əvəzinə, **hidrogen** (H) atomuna malikdirlər.*



Normal dNTP



ddNTP

Didoxcy nukleotidləri kimi modifikasiya olunmuş nukleotidlər, bir sequencing daxilinə integrasiya olunan zaman digər nukleotidlərin əlavə edilməsinin qarşısını alır.

Didoxcy nukleotid ilə sequencing-ə qoşulan növbəti nukleotid arasında fosfodiefir rabitəsi yarana bilmədiyindən, DNT zəncirinin qurulması (uzanması) sona çatır.

Taq polymerase+Primer+DNA+dNTP



Taq polymerase+Primer+DNA+dNTP



Taq polymerase+Primer+DNA+dNTP



Taq polymerase+Primer+DNA+dNTP



Praymer

5'GAATGTCCTTTCTCTAAG3'

Sonra zəncirvari polimeraza reaksiyası yerinə yetirilir və hər tyubda olan PZR məhsulları poliakrilamid geli üzərində elektroforez edilir.

Fərz edək ki, aşağıda göstərilən 49 nukleotiddən ibarət bir DNT fraqmentinin ardıcılığını oxumaq istəyirik.

3'CTTACAGGAAAGAGATTCAGGATTCAGGAGGCCTACCATGAAGATCAAG5'

DNT sintez edilən zaman nukleotidlər DNT polimeraza vasitəsilə artırılan zəncirə əlavə olunmağa başlanırlar. Lakin DNT zənciri artırılan zaman normal nukleotid yerinə zəncirdə dideoxynukleotidinin yerləşməsi ana zəncirin uzadılmasının dayandırılması ilə nəticələnir.

Misal olaraq, “G” tyubuna baxdıqda, müxtəlif məhsullara rast gəlmək mümkündür.

5' - GAAATGTCCTTTCTCTAAAGTCCTAAAG
3' - CTTACAGGAAAAGAGATTCAGGATTCAGGAGGCCTACCATGAAAGATCAAAG-5'

5' - GAAATGTCCTTTCTCTAAAGTCCTAAAGTCCTCCG
3' - CTTACAGGAAAAGAGATTCAGGATTCAGGAGGCCTACCATGAAAGATCAAAG-5'

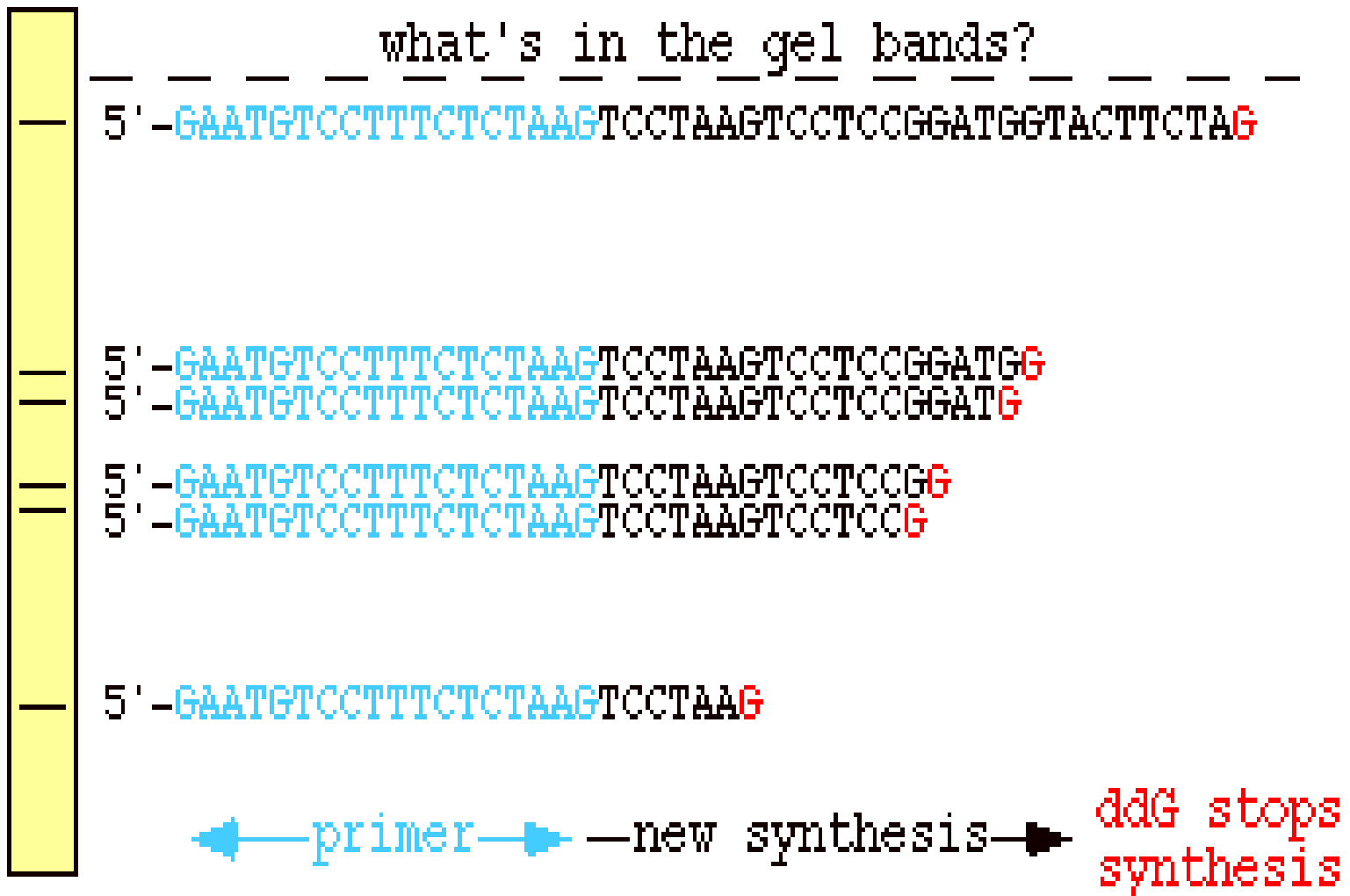
5' - GAAATGTCCTTTCTCTAAAGTCCTAAAGTCCTCCGG
3' - CTTACAGGAAAAGAGATTCAGGATTCAGGAGGCCTACCATGAAAGATCAAAG-5'

5' - GAAATGTCCTTTCTCTAAAGTCCTAAAGTCCTCCGGATG
3' - CTTACAGGAAAAGAGATTCAGGATTCAGGAGGCCTACCATGAAAGATCAAAG-5'

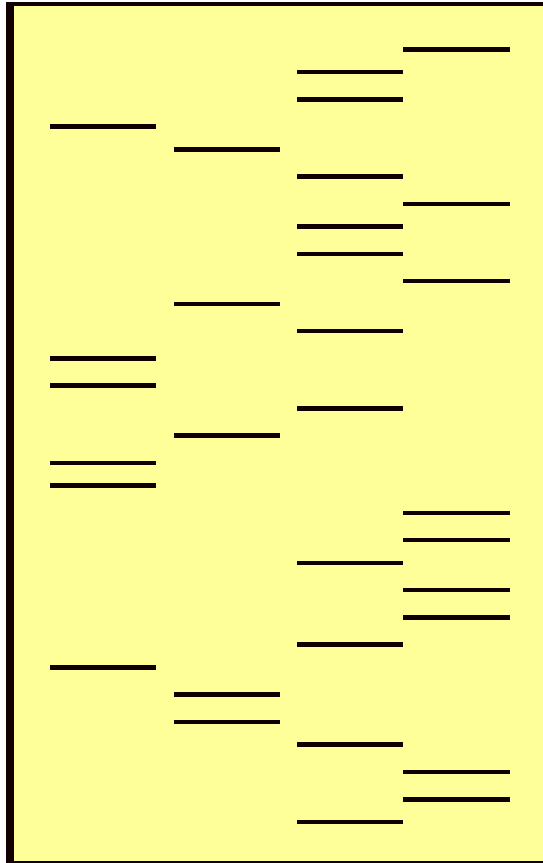
5' - GAAATGTCCTTTCTCTAAAGTCCTAAAGTCCTCCGGATGG
3' - CTTACAGGAAAAGAGATTCAGGATTCAGGAGGCCTACCATGAAAGATCAAAG-5'

5' - GAAATGTCCTTTCTCTAAAGTCCTAAAGTCCTCCGGATGGTACTTCTAG
3' - CTTACAGGAAAAGAGATTCAGGATTCAGGAGGCCTACCATGAAAGATCAAAG-5'

Polyacrylamide gel electrophoresis of the "G" reaction



G A T C



5' TCCTAAGTCCTCCGGATGGTACTTCTAGTTC 3'

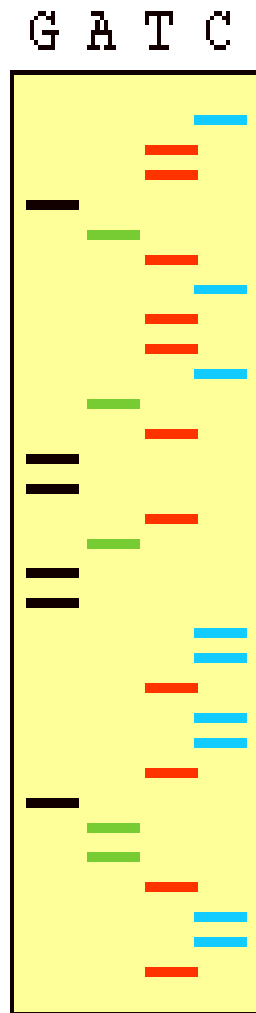
5' GAATGTCCTTTCTCTAAG 3'

Praymer

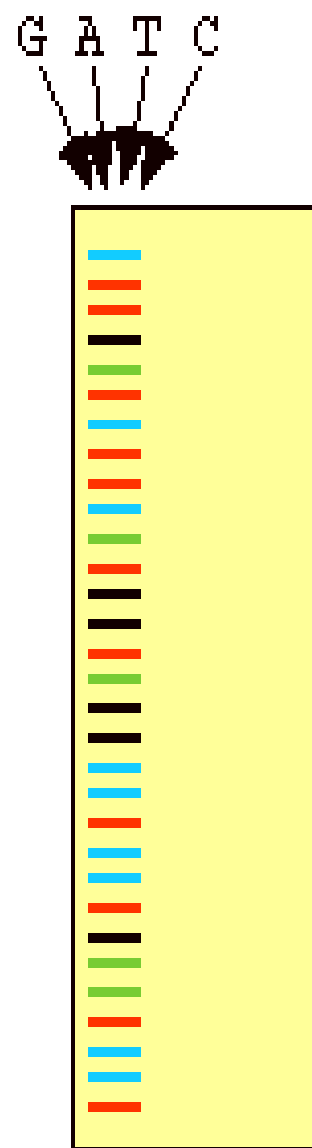
1974-cü ildən bəri texnologiyaların təkmilləşdirilməsi sahəsində əldə olunmuş çoxsaylı nailiyyətlərin mövcudluğu tədricən Sanger üsulunun köhnəlməsində təəccüb doğurmur. Lakin Sanger metodunu əvəz edən yeni texnologiyaların hamısı Sanger üsulunun işləmə prinsiplərinə əsaslanır. Avtomatlaşdırılmış sequencing qısa zaman fasiləsində genomun böyük hissəsinin oxunmasına şərait yaradır.

Avtomatlaşdırılmış prosesdə ddNTP-lərin hər biri fərqli rənglərlə etikətlənir və bir yerdə bütün reaksiyalar yalnız bir tyub daxilində yerinə yetirilir.





Here's what the products would look like in separate gel lanes.

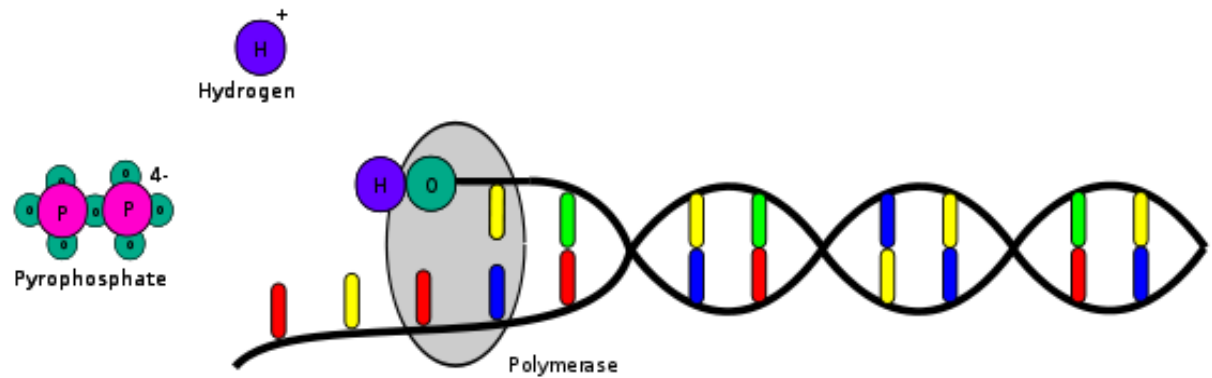
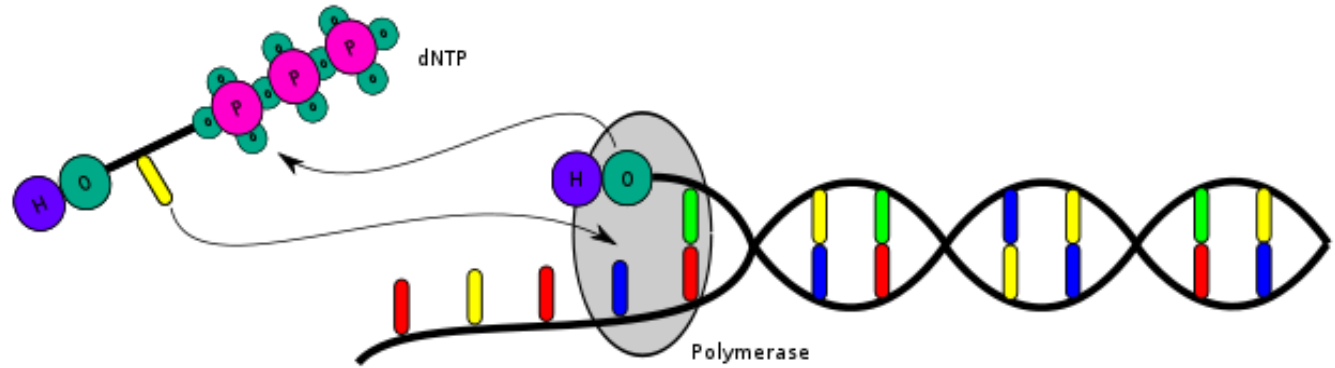


Here's what the products would look like in a single gel lanes.

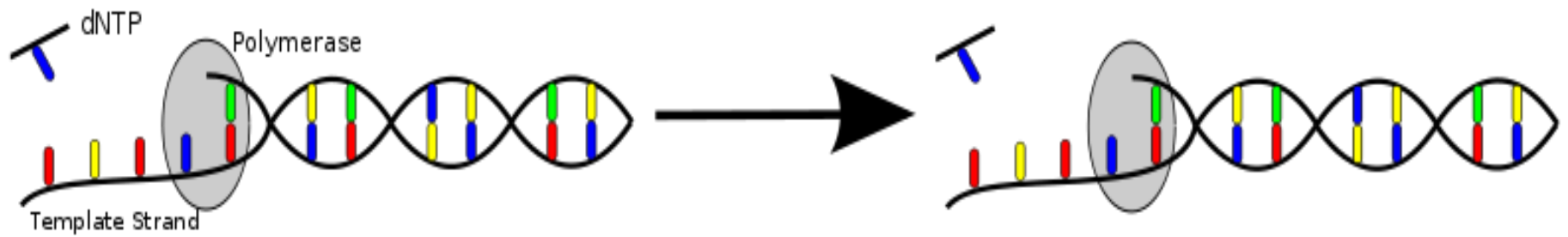
Ion Torrent

İon yarımkeçirici sekvenator (Ion semiconductor sequencing) DNT–nin polimerləşməsi nəticəsində ayrılan hidrogen ionu əsasında DNT ardıcılığının oxunma metodudur.

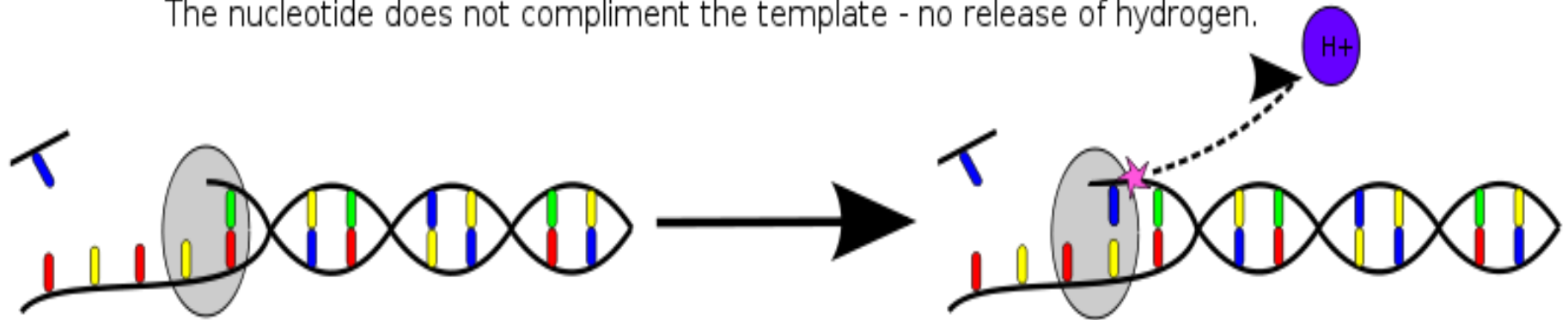




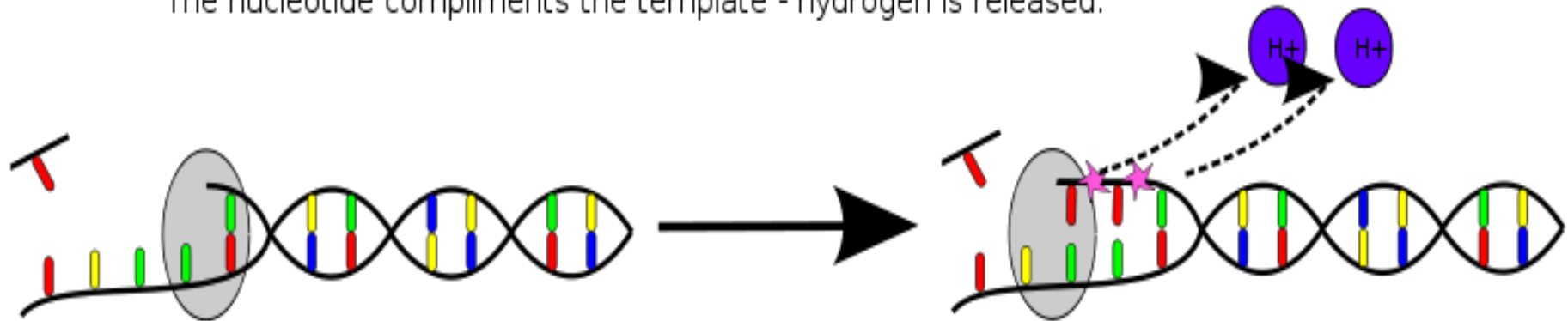
Hydrogen and pyrophosphate are released.



The nucleotide does not compliment the template - no release of hydrogen.

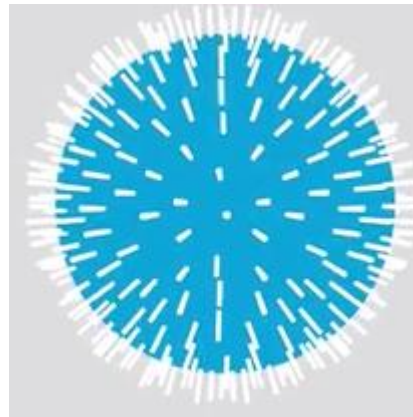
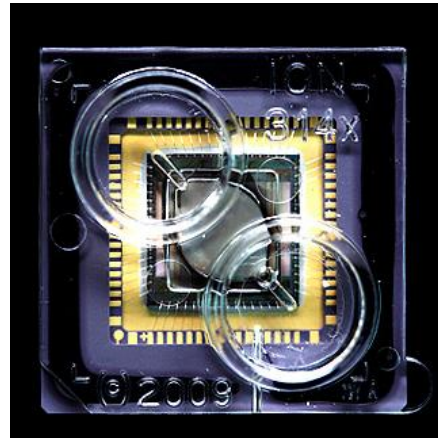


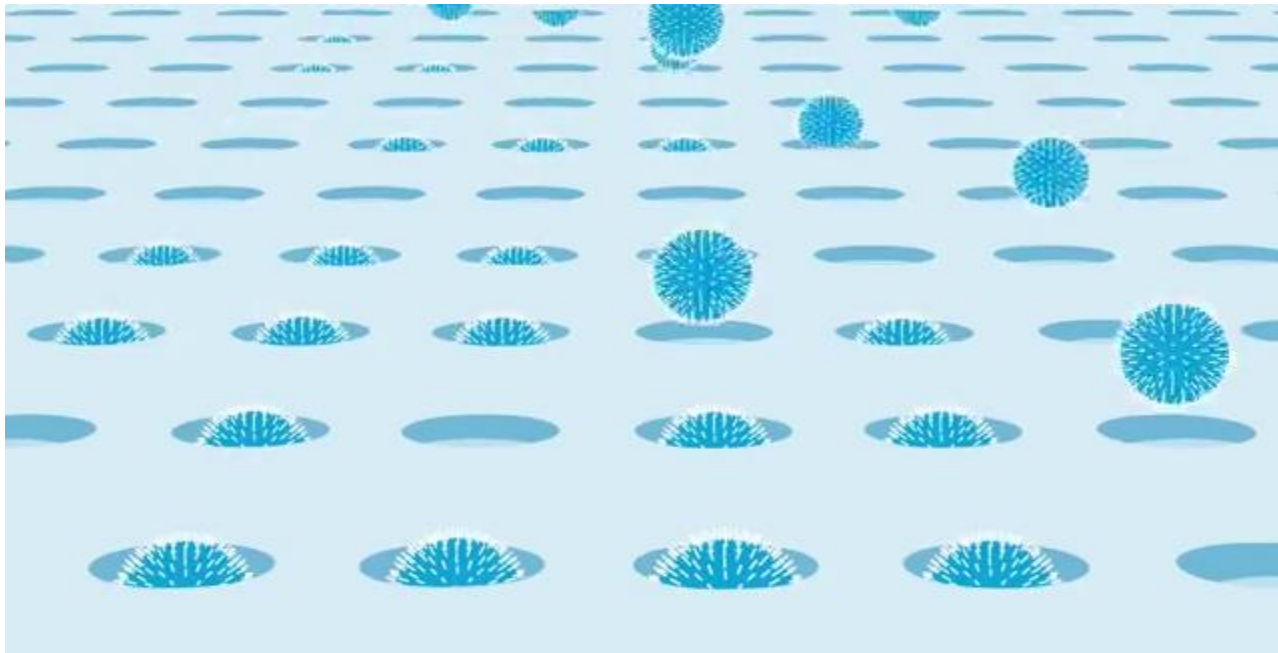
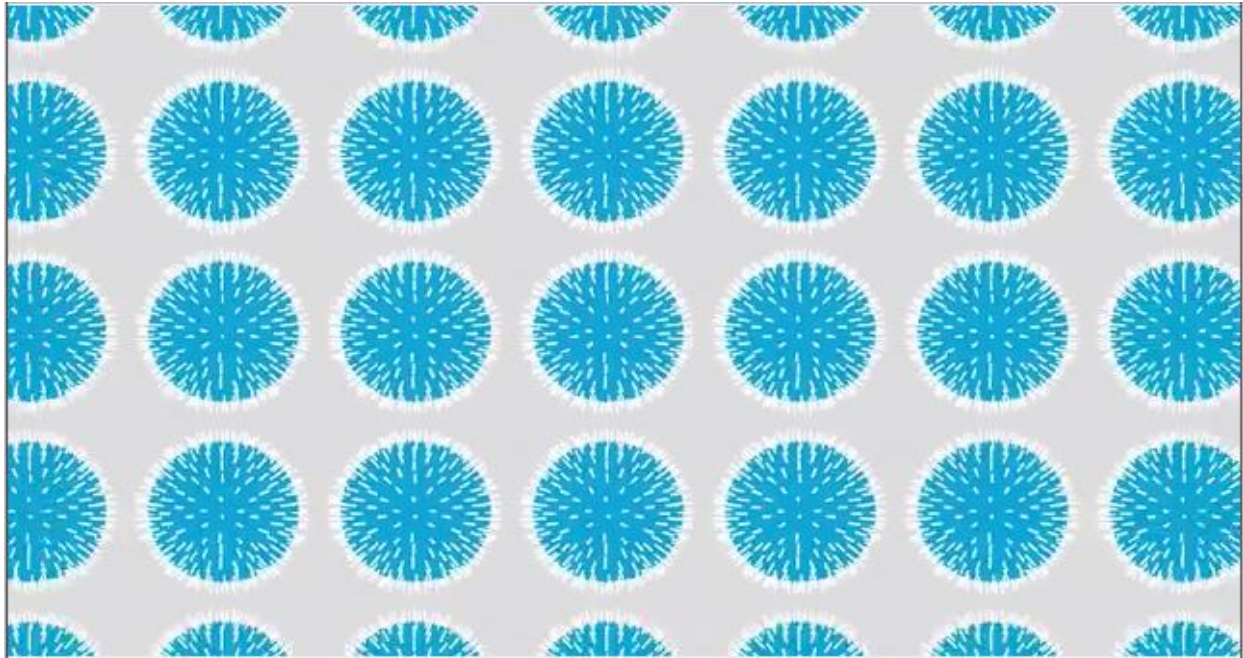
The nucleotide compliments the template - hydrogen is released.

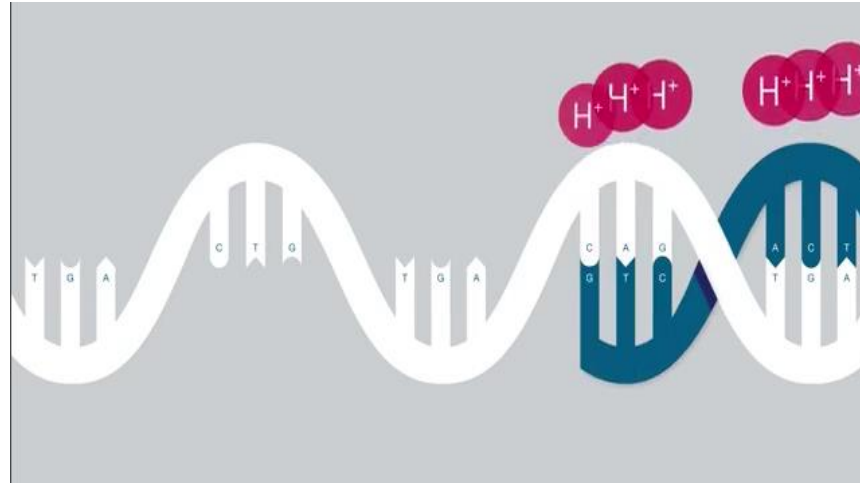
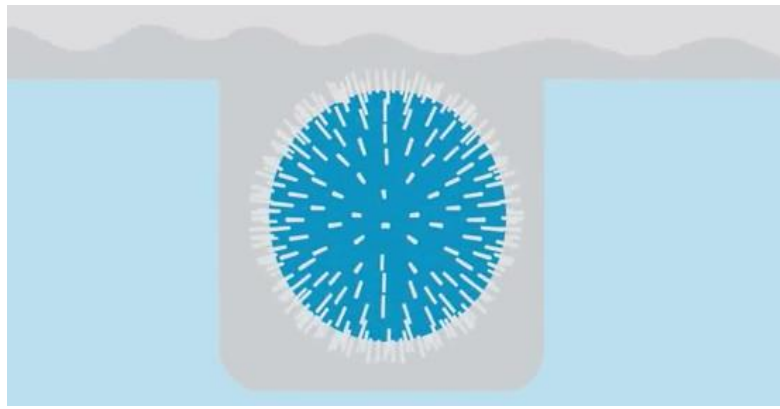


The nucleotide compliments several bases in a row - multiple hydrogen ions are released.

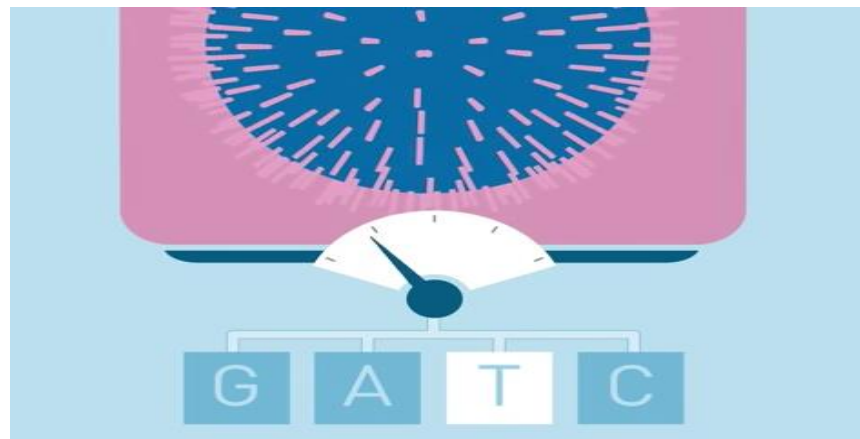
Mikro çiplər üzərində milyonlarla mikroyuvacıqlar (microwells) mövcuddur. Bir zəncirli DNT fraqmentlərinin hər biri amplifikasiya nəticəsində müxtəlif sayda bir beadlə birləşərək, təsadüfi şəkildə çiplərdəki yuvacıqlarda paylanırlar. Hər bead bir fraqment deməkdir, beləliklə, milyonlarla bead milyon fraqmentin təzahürü deməkdir.

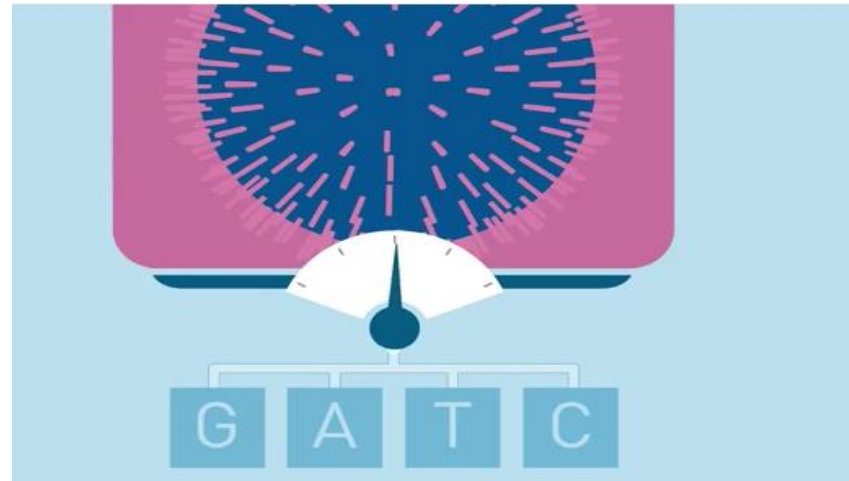
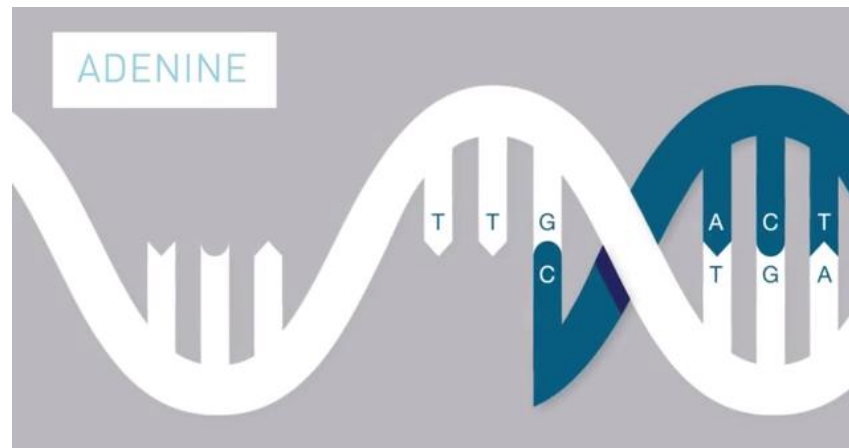






*Hər yuvacıq altında ISFET (**ion-sensitive field-effect transistor**) adlı ion sensor mövcuddur.*





Diqqətinizə görə təşəkkür edirəm!

